

三维试验检测耐头孢他啶铜绿假单胞菌产 β-内酰胺酶

陈 红(湖南省益阳市第三人民医院检验科 413000)

【摘要】 目的 了解耐头孢他啶铜绿假单胞菌产 β-内酰胺酶的现状。**方法** 采用 K-B 法进行药敏试验,筛选耐头孢他啶的铜绿假单胞菌,采用改良三维试验检测各种 β-内酰胺酶。**结果** 65 株临床分离耐头孢他啶铜绿假单胞菌中产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs) 30 株(46.2%), AmpC 酶 4 株(6.2%), 同时产 ESBLs 和 AmpC 酶 10 株(15.4%), 同时产金属酶和产 ESBLs 15 株(23.1%), 同时产 AmpC 酶和金属酶 2 株(3.1%)。**结论** 益阳市第三人民医院铜绿假单胞菌以产 ESBLs 为主,其次为 AmpC 酶和金属酶。

【关键词】 铜绿假单胞菌; β-内酰胺酶; 三维实验; 耐药; 头孢他啶

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.10.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)10-1210-02

Three-dimensional method applied to detect beta-lactamases in ceftazidime-resistant P. Aeruginosa CHEN Hong (Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Yiyang, Hunan 413000, China)

【Abstract】 Objective To analyze beta-lactamase in ceftazidime-resistant P. Aeruginosa. **Methods** The strains of ceftazidime-resistant P. Aeruginosa were selected with K-B susceptibility method. Three-dimensional method was used to differentiate and analyze the various beta-lactamases. **Results** In 65 strains ceftazidime-resistant P. Aeruginosa, 40 strains (46.2%) could produce expanded spectrum beta-lactamases (ESBLs), 4 strains (6.2%) could produce AmpC, 10 strains (15.4%) could produce both ESBLs and AmpC, 15 strains (23.1%) could produce both metallo-beta-lactamases and ESBLs, 2 strains (3.1%) could produce both AmpC and metallo-beta-lactamases. **Conclusion** The ceftazidime-resistant P. Aeruginosa strain producing ESBLs might be priority, followed by AmpC enzyme and metallo-beta-lactamases.

【Key words】 P. Aeruginosa; beta-lactamases; three-dimensional method; drug resistance; ceftazidime

铜绿假单胞菌为专性需氧非发酵革兰阴性杆菌,广泛存在于自然环境中,是医院及社区感染中常见病原菌,可引起包括皮肤软组织感染、肺炎、败血症等在内的多种疾病^[1]。近年来,随着广谱抗菌药物广泛使用,铜绿假单胞菌多重耐药现象日趋严重。有研究表明,铜绿假单胞菌产生各种产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs),是其对 β-内酰胺类抗菌药物耐药的重要机制^[2]。为了解本院铜绿假单胞菌产 β-内酰胺酶现状,本研究对 2009 年 6 至 2012 年 5 月本院临床标本中出现的耐头孢他啶铜绿假单胞菌采用改良三维试验检测其 β-内酰胺酶,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2009 年 6 月至 2012 年 5 月本院临床标本中分离的耐头孢他啶铜绿假单胞菌非重复菌株 65 株。

1.2 试剂 M-H 培养基干粉购自英国 Oxoid 公司,克拉维酸(CLA)、氯唑西林(CLO)购自中国药品生物制品检定所,其余所有药敏纸片均购自英国 Oxoid 公司。

1.3 方 法

1.3.1 菌株鉴定及药敏试验 各临床科室送检标本经培养后取可疑菌落按《全国临床检验操作规程》(第 3 版)进行操作鉴定。药敏试验采用 K-B 法,结果判定参照 2012 年美国临床实验室标准化协会标准执行。以大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)为标准质控菌株。

1.3.2 改良三维试验检测 ESBLs、AmpC 和金属酶 三维试验参照文献^[3]并进行改良。酶粗提物制备:取纯培养菌落 2~3 个,涂在 1/4 M-H 平皿上 37℃ 孵育过夜;刮下菌苔于 1 mL 生理盐水中,4℃,4 000 r/min 离心 20 min 后弃上清液,加入 700 μL 生理盐水于 EP 管中,-20℃ 保存,反复冻融 6 次,4℃,12 000 r/min 离心 20 min,上清液经常规细菌培养结果为阴性后,置-20℃ 保存备用。三维试验:取 2 个 M-H 平皿,分别均匀涂布 0.5 麦氏单位大肠埃希菌(ATCC 25922),平皿中

央分别贴 30 μg 头孢噻肟和亚胺培南,距离纸片边缘 5 mm 处打孔,贴头孢噻肟的平皿分别加 45 μL 酶粗提液加 5 μL 生理盐水、45 μL 酶粗提液加 5 μL 2 mmol 克拉维酸、45 μL 酶粗提液加 5 μL 2 mmol 氯唑西林、45 μL 酶粗提液加 5 μL 2 mmol 克拉维酸加 5 μL 2 mmol 氯唑西林;贴亚胺培南的平皿分别加 45 μL 酶粗提液加 5 μL 生理盐水、45 μL 酶粗提液加 5 μL 0.5 mol 乙二胺四乙酸(EDTA)于孔中,避免酶粗提液溢出孔外,35℃ 温箱孵育过夜。孔与抑菌圈交界处出现扩大的长菌区域,表明该酶能水解头孢噻肟或亚胺培南,同时观察能否被 CLA、CLO 和 EDTA 所抑制。以阴沟肠杆菌为阳性对照,以大肠埃希菌(ATCC 25922)为阴性对照。

2 结 果

2.1 药敏试验 65 株耐头孢他啶铜绿假单胞菌药敏试验结果见表 1。

表 1 65 株耐头孢他啶铜绿假单胞菌药敏试验(%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
头孢哌酮/舒巴坦	15.38	4.62	80.00
阿米卡星	23.08	1.54	75.38
亚胺培南	38.46	4.62	56.92
环丙沙星	46.15	6.15	47.70
哌拉西林/他唑巴坦	47.69	4.62	47.69
左氧氟沙星	49.23	3.08	47.69
头孢吡肟	87.69	9.23	3.08
庆大霉素	89.23	0.00	10.77
氨基糖苷	95.38	3.08	1.54
头孢曲松	96.92	3.08	0.00
氨苄西林/舒巴坦	98.46	0.00	1.54
头孢他啶	100.00	0.00	0.00
头孢唑啉	100.00	0.00	0.00
哌拉西林	100.00	0.00	0.00

2.2 改良三维试验测定 65 株耐头孢他啶铜绿假单胞菌见表 2。65 株耐头孢他啶铜绿假单胞菌中,单产 ESBLs 30 株,单产 AmpC 酶 4 株,同时产 ESBLs 和 AmpC 酶 10 株,同时产

ESBLs 和金属酶 15 株,同时产 AmpC 酶和金属酶 2 株,产其他 β -内酰胺酶 4 株。

表 2 65 株耐头孢他啶铜绿假单胞菌药物敏试验结果

项目	菌株数	水解底物		抑制剂			
		头孢噻肟	亚胺培南	CLA	CLO	CLA/CLO	EDTA
ESBLs	30	+	/	+	/	+	/
AmpC	4	+	/	/	+	+	/
ESBLs 和 AmpC	10	+	/	/	/	+	/
ESBLs 和金属酶	15	+	+	+	/	+	+
AmpC 和金属酶	2	+	+	/	+	+	+
其他 β -内酰胺酶	4	+	/	/	/	/	/

注:/表示无结果,+表示阳性。

3 讨 论

头孢他啶是治疗铜绿假单胞菌感染的一线药物。近年来,随着 β -内酰胺类抗菌药物的广泛应用,铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药性明显上升,且常因对多种抗菌药物耐药而导致治疗失败,已成为临床抗感染治疗的棘手难题。由表 1 可见,耐头孢他啶的铜绿假单胞菌通常伴有其他多类抗菌药物耐药。目前引起临床关注的 β -内酰胺酶有:ESBLs、AmpC、对酶抑制剂敏感性下降的 β -内酰胺酶(IRTs)、金属酶和非金属酶的碳青霉烯酶。铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类药物耐药主要产生各种 β -内酰胺酶,它们可定位于质粒或染色体上,对 β -内酰胺酶高度耐药和酶抑制剂耐药。在院内感染的监测中,为了便于及时切断耐药基因的传播,监测细菌的产酶机制有十分重要的意义^[4]。

改良三维试验利用 ESBLs 能被 CLA 抑制,不被 CLO 抑制;AmpC 酶则不能被 CLA 抑制,但可被 CLO 抑制;金属酶可被 EDTA 抑制等特性来检测 ESBLs、AmpC 酶和金属酶。采用细菌酶液进行操作,避开细菌外膜渗透机制和抗菌药物泵出机制对试验的干扰,因而不受抗菌药物的诱导、细菌表型和外界因素的影响,可更准确地同时检测铜绿假单胞菌 ESBLs、AmpC 酶和金属酶^[5-6]。由表 2 可见,46.2%(30/65)菌株单产 ESBLs,6.2%(4/65)菌株单产 AmpC 酶,15.4%(10/65)菌株同时产 ESBLs 和 AmpC 酶,23.1%(15/65)菌株同时产金属酶和 ESBLs,3.1%(2/65)菌株同时产 AmpC 酶和金属酶,6.2%(4/65)菌株产其他 β -内酰胺酶,这与文献[3,7-9]报道的有所不同,可能与各地区使用抗菌药物的种类和频率不同有关。本研究表明,本院耐头孢他啶铜绿假单胞菌产 ESBLs 达 84.7%,产金属酶和 AmpC 酶分别为 26.2%和 24.7%,而 41.6%的菌株同时产两种 β -内酰胺酶。说明本院分离铜绿假单胞菌不仅产酶高,而且产酶种类较多,可能是对 β -内酰胺酶类药物广泛耐药的重要机制,应引起临床高度重视。

综上所述,本院耐头孢他啶铜绿假单胞菌对 β -内酰胺酶类药物耐药主要与其产 ESBLs 有关,其次为 AmpC 酶和金属酶。控制产酶菌株在本院的播散及流行已刻不容缓,临床在治疗该类细菌感染时,应及时根据药敏试验结果合理选用抗菌药物。

参考文献

- [1] Walkty A, Decorby M, Nichol K, et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients in Canadian intensive care units as part of the Canadian National Intensive Care Unit study[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61(2): 217-221.
- [2] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*; resistance mechanisms and implications for therapy[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, 8(1): 71-93.
- [3] 聂大平, 朱杰, 石鸿宴. 耐头孢他啶铜绿假单胞菌与 β -内酰胺酶的关系[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(5): 685-686.
- [4] Jukemura EM, Burattini MN, Pereira CA, et al. Control of multi-resistant bacteria and ventilator-associated pneumonia: is it possible with changes in antibiotics[J]. *Braz J Infect Dis*, 2007, 11(4): 418-422.
- [5] 张风华, 袁宏, 肖晓光, 等. 三维实验法检测耐亚胺培南的铜绿假单胞菌产 β -内酰胺酶[J]. *大连医科大学学报*, 2009, 31(5): 589-591.
- [6] 胡付品, 朱德妹, 吴淦, 等. 三维实验法检测肠杆菌细菌中超广谱 β -内酰胺酶和 AmpC 酶[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2004, 4(4): 283-286.
- [7] 陈建国, 李国明. 铜绿假单胞菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的检测和耐药性分析[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(7): 946-948.
- [8] 孟灵, 王应芳, 张润玲. 三维试验检测革兰阴性杆菌 ESBLs 及 AmpC 酶[J]. *检验医学*, 2007, 22(4): 694-696.
- [9] 项领, 浓翠芳. 多重耐药铜绿假单胞菌 ESBLs 和 AmpC 酶检测与分析[J]. *江西医学检验杂志*, 2007, 25(2): 187-190.

(收稿日期:2012-11-13)